

**POTENSI SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL DAN TIGA FRAKSI DAUN
SIRIH MERAH (*Piper crocatum*) TERHADAP SEL KANKER SERVIKS HeLa**



**Disusun sebagai salah satu syarat menyelesaikan Program Studi Strata I
pada Fakultas Farmasi**

Oleh:

AJENG GANURMALA

K 100 140 080

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
2018**

HALAMAN PERSETUJUAN

**POTENSI SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL DAN TIGA FRAKSI DAUN
SIRIH MERAH TERHADAP SEL KANKER SERVIKS HeLa**

PUBLIKASI ILMIAH

oleh:

AJENG GANURMALA

K 100 140 080

Telah diperiksa dan disetujui untuk diuji oleh:

Dosen
Pembimbing



Ratna Yuliani, M.Biotech.st

NIK.957

HALAMAN PENGESAHAN

**POTENSI SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL DAN TIGA FRAKSI DAUN
SIRIH MERAH (*Piper crocatum*) TERHADAP SEL KANKER SERVIKS HeLa**

OLEH

AJENG GANURMALA

K 100 140 080

**Telah dipertahankan di depan Dewan Penguji
Fakultas Farmasi
Universitas Muhammadiyah Surakarta
Pada hari Senin, 23 Juli 2018
dan dinyatakan telah memenuhi syarat**

Dewan Penguji:

1.Dr. Haryoto, M.Sc.

(Ketua Dewan Penguji)

2.Maryati, Ph.D., Apt

(Anggota I Dewan Penguji)

3.Ratna Yuliani, M.Biotech.St.

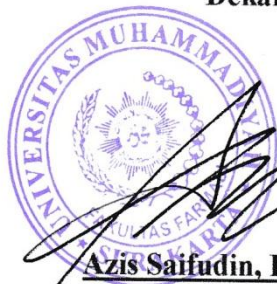
(Anggota II Dewan Penguji)

(.....)

(.....)

(.....)

Dekan,



Azis Saifudin, Ph.D., Apt.

NIK. 956

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam naskah publikasi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali secara tertulis diacu dalam naskah dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kelak terbukti ada ketidakbenaran dalam pernyataan saya di atas, maka akan saya pertanggungjawabkan sepenuhnya.

Surakarta, 8 Agustus 2018

Penulis



AJENG GANURMALA

K 100 140 080

POTENSI SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL DAN TIGA FRAKSI DAUN SIRIH MERAH (*Piper crocatum*) TERHADAP SEL KANKER SERVIKS HeLa

Abstrak

Daun sirih merah merupakan tanaman yang banyak dimanfaatkan sebagai obat-obatan, salah satunya memiliki potensi sitotoksik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksik ekstrak etanol dan tiga fraksi daun sirih merah (*Piper crocatum*) terhadap sel kanker serviks HeLa serta mengetahui golongan senyawa yang terkandung. Ekstrak etanol diperoleh dengan metode maserasi, sedangkan fraksi heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air diperoleh menggunakan fraksinasi metode partisi cair-cair. Uji sitotoksik dilakukan dengan metode MTT, absorbansi dibaca dengan ELISA reader pada $\lambda = 550$ nm. Golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak dan fraksi diidentifikasi menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Ekstrak etanol dan fraksi tidak memiliki potensi sitotoksik dengan nilai IC_{50} masing-masing sebesar 544,29 $\mu\text{g/mL}$ dan 528,54 $\mu\text{g/mL}$. Fraksi etil asetat dan fraksi air juga tidak memiliki potensi sitotoksik terhadap sel HeLa karena $IC_{50} \geq 501$ $\mu\text{g/mL}$. Paklitaksel digunakan sebagai kontrol positif dengan nilai IC_{50} sebesar 8,15 $\mu\text{g/mL}$. Kandungan senyawa pada ekstrak etanol dan fraksi heksan ialah flavonoid, alkaloid, fenolik, triterpen dan steroid. Fraksi etil asetat mengandung flavonoid, fenolik, triterpen dan steroid. Fraksi air mengandung fenolik.

Kata Kunci: fraksi, HeLa, *Piper crocatum*, sitotoksik, uji MTT.

Abstract

Red betel leaf (*Piper crocatum*), a plant widely used as medicine, has to cytotoxic potential. This study aimed to determine the activity of cytotoxic ethanol extract and three fractions of red betel leaves against cervical cancer cells HeLa and know the class of compounds in the ethanol extract and three fractions of red betel leaves. The ethanol extract was obtained by maceration method, while the hexane fraction, ethyl acetate fraction and water fraction were obtained by fractionation of liquid-liquid partition method. The cytotoxic test used MTT method, then absorbance was read by ELISA reader $\lambda = 550$ nm. Groups of compounds in extracts and fractions were identified used thin layer chromatography (TLC). Ethanol extract and hexane fraction have no cytotoxic effect with IC_{50} values at 544.29 and 528.54 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Ethyl acetate and water fraction also have no cytotoxic effect on HeLa cells with $IC_{50} \geq 501$ $\mu\text{g/mL}$. The positive control used was paclitaxel with IC_{50} value of 8.15 $\mu\text{g/mL}$. Ethanol extract and hexane fractions contains flavonoids, alkaloids, phenolics, triterpenes and steroids. Ethyl acetate fractions contains flavonoids, phenolic, triterpene and steroids. The water fraction contain phenolics.

Keywords: fraction, HeLa, *Piper crocatum*, cytotoxic, MTT assay.

1. PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyakit yang diinduksi dari abnormalitas genetik akibat pewarisan genetik ataupun perubahan sel-sel somatik setelah terpapar zat-zat karsinogenik (Yudhani, 2014). Kanker

merupakan masalah utama penyakit di dunia dan penyebab kematian nomor dua di Amerika Serikat. Salah satu jenis kanker yakni kanker serviks (Siegel *et al.*, 2016). Kanker serviks merupakan kanker yang disebabkan oleh infeksi virus papiloma yang persisten. *Human papilloma virus* terdeteksi pada 99% tumor serviks, terutama sub tipe onkogenik seperti HPV 16 dan 18. Pencegahan utama kanker serviks dengan imunisasi melalui vaksin Human papilloma virus dan pencegahan sekunder dengan pengujian DNA HPV yang sensitif untuk memperbaiki program skrining sitologi Pap (Kemenkes RI, 2015). WHO mencatat kanker serviks menduduki peringkat keempat kanker paling umum pada wanita dengan 528.000 kasus baru dan 266.000 angka kematian di tahun 2012 (WHO, 2012). Menurut Kementerian Kesehatan RI Pusat Data dan Informasi Kesehatan (2015), di RS Kanker Dharmas tahun 2010-2013 terdapat 1.295 kasus baru dengan 178 kematian akibat kanker serviks. Tatalaksana terapi kanker serviks meliputi operasi, kemoradioterapi, terapi adjuvant, dan terapi paliatif (Marth *et al.*, 2017). Efek samping pengobatan tersebut ialah mual, kelelahan, dan rambut rontok. Efek samping tersebut karena obat-obatan kemoterapi berefek kuat, selain membunuh sel-sel kanker, juga menyerang sel-sel normal seperti sel sumsum tulang belakang, rambut, kulit, dan sel-sel lainnya yang memiliki aktivitas membelah dengan cepat (Setiawan, 2015). Efek samping yang merugikan tersebut memicu adanya perkembangan pengobatan alternatif yang berasal dari bahan alam.

Indonesia memiliki keanekaragaman tanaman, baik tanaman hias ataupun tanaman obat. Daun sirih merah (*Piper crocatum*) merupakan tanaman yang banyak dimanfaatkan sebagai obat-obatan dan memiliki karakter morfologi yang cukup bervariasi dalam bentuk daun. Daun sirih merah memiliki aktivitas sebagai antioksidan, antihiperglikemik, dan antikanker. Identifikasi fitokimia membuktikan bahwa ekstrak air dan etanol 30% daun sirih merah mengandung flavonoid, tanin, dan alkaloid (Suhermanto, 2013). Menurut Arome and Amarachi (2014), ekstrak metanol daun sirih merah mengandung saponin, tanin, dan terpen yang digunakan dalam pengobatan kanker payudara. Hasil spektrum GC-MS ekstrak etanol daun sirih merah menunjukkan adanya senyawa neopitadin, elimisin dan asam propionat (Suci, 2014). Ekstrak metanol daun sirih merah memiliki efek sitotoksik terhadap sel T47D dengan nilai IC_{50} sebesar 44,25 $\mu\text{g/mL}$ dan mampu menghambat proliferasi sel melalui jalur p44/ p42 (Wicaksono *et al.*, 2009). Menurut Anugrahwati *et al.* (2016), ekstrak etanol daun sirih merah berpotensi menghambat proliferasi sel HeLa dengan nilai LC_{50} $0,81 \pm 0,26 \text{ mg/mL}$. Ekstrak etanol 30% daun sirih merah dengan konsentrasi 800 ppm mampu menghambat 38% pertumbuhan sel HeLa dengan metode MTT (Suci, 2014). Penelitian ini menguji potensi sitotoksik ekstrak dan tiga fraksi daun sirih merah terhadap sel kanker serviks HeLa serta mengetahui kandungan senyawa yang terdapat di dalamnya.

2. METODE

2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini ialah timbangan analitik (Ohaus), wadah maserasi, alat-alat gelas (Pyrex), corong Buchner, *vacum rotary evaporator* (Heidolph), *waterbath* (Memmert), sonikator (Branson 2510), vorteks (Thermolyne Corporation, tipe Maxi Mix II 37600), oven (BINDER), lampu UV 254 dan UV 366 nm, *Cytotoxic Safety Cabinet* (ESCO, tipe *cyticulture*), hemositometer (Marienfield Germany), inkubator CO₂ (BINDER), mikropipet (Socorex), mikroskop cahaya (Olympus CKX41), ELISA *reader* (ELx800 Bio Tech) dan kamera.

2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini ialah daun sirih merah yang diperoleh dari daerah Slogohimo, Wonogiri, Jawa Tengah, etanol 96%, heksan, etil asetat, metanol, diklorometan, akuades, kertas saring, sel kanker serviks HeLa, mikropate 96 sumuran (Iwaki), *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO), media kultur *Rosewell Park Memorial Institue* (RPMI), penisilin-streptomisin, fungizon 0,5%, *Fetal Bovine Serum* (FBS), *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) 10%, *Phosphate Buffered Saline* (PBS), larutan MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2-il),2,5-difenil tetrazolium bromid), HCL 0,1 N, aluminium foil, tripsin-EDTA (tripsin 0,25%), paklitaksel (Sanbe Farma), *tissue culture flask*, *white tips*, *blue tips*, *yellow tips*, silika gel GF254, reagen semprot Dragendorff, reagen semprot sitroborat, reagen semprot FeCl₃, dan reagen semprot Liebermann-Burchard.

2.3 Ekstraksi dan Fraksinasi

Serbuk daun sirih merah sebanyak 296,48 g direndam dalam 3 L etanol 96% dalam wadah tertutup selama 3 hari sambil sesekali diaduk. Kemudian ekstrak disaring menggunakan corong Buchner dan diuapkan menggunakan *vacum rotary evaporator* pada suhu 60°C sampai tersisa sedikit ekstrak lalu dipekatkan dengan *waterbath*. Ekstrak selanjutnya difraksinasi dengan metode cair-cair. Empat gram ekstrak dilarutkan dalam akuades dan etanol dengan masing-masing volume 40 mL dan 10 mL kemudian dimasukkan dalam corong pisah dan ditambahkan dengan heksan 50 mL kemudian digojog. Fraksinasi dengan heksan dilakukan sebanyak 9 kali sampai lapisan heksan bening. Lapisan heksan tersebut dipisah, kemudian lapisan air dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan etil asetat 50 mL, difraksinasi sebanyak 7 kali sampai mendapatkan lapisan air dan etil asetat. Lapisan air dipisahkan dengan lapisan etil asetat. Fraksi diuapkan dengan *vacum rotary evaporator* pada 60°C lalu dipekatkan dengan *waterbath*.

2.4 Uji Sitotoksik

Ekstrak etanol, fraksi heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air masing-masing ditimbang seberat 10 mg kemudian ditambahkan 100 µL DMSO dan 1 mL RPMI, dilarutkan dengan bantuan *vortex*.

Ekstrak dan tiga fraksi yang sudah larut dipindah ke dalam tabung konikal dan ditambahkan media RPMI sampai 10 mL. Dari pengenceran stok dalam DMSO menggunakan RPMI dibuat seri kadar sampel yaitu 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL.

Sel kanker HeLa yang sudah panen diambil 1 mL dan ditambahkan media sampai 10 mL. Sel dalam media dimasukkan ke dalam sumuran sebanyak 100 µL dengan kepadatan 10^4 sel/ sumuran dan diinkubasi selama 48 jam dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C, kemudian media sel dibuang dengan membalikkan *plate* 180°. Seratus mikroliter PBS dimasukkan ke dalam sumuran yang berisi sel, kemudian PBS dibuang dengan membalikkan *plate* 180°. Seri konsentrasi ekstrak etanol, tiga fraksi dan kontrol positif paklitaksel dimasukkan ke dalam sumuran dan diinkubasi 24 jam. Reagen MTT disiapkan dengan mengambil 1 mL stok reagen MTT dalam PBS dan diencerkan dengan RPMI sampai 10 mL. Seratus mikroliter reagen MTT dimasukkan ke seluruh sumuran pada 96 *well plate*, diinkubasi selama 2 jam dalam inkubator CO₂. Jika formazan telah terbentuk jelas, ditambahkan reagen *stopper* 100 µL SDS 10% dalam 0,01 N HCl, kemudian *plate* dibungkus dengan kertas HVS dan diinkubasi semalam. Absorbansi dibaca menggunakan ELISA *reader* pada $\lambda = 550$ nm. Data dianalisis untuk mendapat nilai IC₅₀ dengan regresi linear log konsentrasi *vs* persen sel hidup (CCRC, 2013).

2.5 Uji Kandungan Golongan Senyawa dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Analisis golongan senyawa menggunakan kromatografi lapis tipis dengan fase diam silika gel GF254. Silika gel terlebih dulu diaktifkan menggunakan oven selama 1 jam pada suhu 105°C. Fase gerak yang digunakan ialah heksan:etil asetat (7:3) untuk ekstrak dan fraksi heksan, heksan:etil asetat (6:4) untuk fraksi etil asetat dan diklorometana:metanol (8:2) untuk fraksi air. Jarak pengembangan elusi sepanjang 5 cm. Bercak pada plat diamati di bawah sinar tampak, UV 254 nm, dan UV 366 nm. Kemudian plat yang sudah dielusi disemprot menggunakan reagen semprot seperti FeCl₃, sitroborat, Liebermann-Burchard dan Dragendorff. Plat yang sudah disemprot reagen diamati kembali pada sinar tampak atau UV 366 nm.

2.6 Analisis data

2.6.1 Uji Sitotoksik

Persentase sel hidup dihitung dengan menggunakan hubungan log kadar *vs* nilai persen sel hidup dan dihitung harga IC₅₀ nya.

Rumus yang digunakan untuk menghitung persentasi sel hidup sebagai berikut:

$$\text{Persentase sel hidup} = \frac{(\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media})}{(\text{Absorbansi kontrol pelarut} - \text{Absorbansi kontrol media})} \times 100\% \quad (1)$$

Hubungan antara log kadar dengan persen sel hidup ditampilkan dalam bentuk grafik. Regresi linier dari grafik digunakan untuk menentukan nilai r . Standar mencari IC_{50} memenuhi jika r lebih besar dari r tabel. Nilai dimasukkan 50% pada persamaan regresi linier, hasil nilai X kemudian nilai IC_{50} ditetapkan dari nilai antilog konsentrasi (CCRC, 2013)

2.6.2 Analisis Kromatografi Lapis Tipis

Identifikasi golongan senyawa pada plat KLT dilakukan di bawah sinar tampak, UV 254 nm dan UV 366 nm serta menggunakan reagen semprot (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil deteksi golongan senyawa

Reagen	Senyawa	Keterangan
$FeCl_3$	Tanin	Hitam pada sinar tampak (Archana <i>et al.</i> , 2012)
Dragendorff	Alkaloid	Jingga kecoklatan pada sinar tampak (Wagner dan Balducci, 1996)
Sitroborat	Flavonoid	Kuning kehijauan di bawah sinar UV 366 nm (Markham, 1988)
Liebermann-Burchard	Triterpen	Merah, merah muda, ungu di bawah UV 366
	Steroid	Biru atau biru-hijau di bawah UV 366
	Sterol jenuh atau triterpen jenuh	Kuning pucat di bawah UV 366 (Farnsworth, 1966)

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Ekstraksi dan Fraksinasi

Ekstraksi adalah proses penarikan senyawa dalam simplisia dengan pelarut air atau organik. Metode ekstraksi yang dipilih untuk menarik senyawa kimia dalam daun sirih merah ialah maserasi karena pengerjaannya yang mudah dengan sedikit gangguan fisik. Pelarut yang digunakan ialah etanol 96% karena memiliki daya penarikan senyawa kimia yang luas. Ekstrak daun sirih merah yang didapat sebesar 14,20 g dengan rendemen 4,78%. Selanjutnya dilakukan fraksinasi, yaitu pemisahan dari ekstrak berdasarkan tingkat kepolarannya. Metode fraksinasi yang digunakan ialah partisi cair-cair.

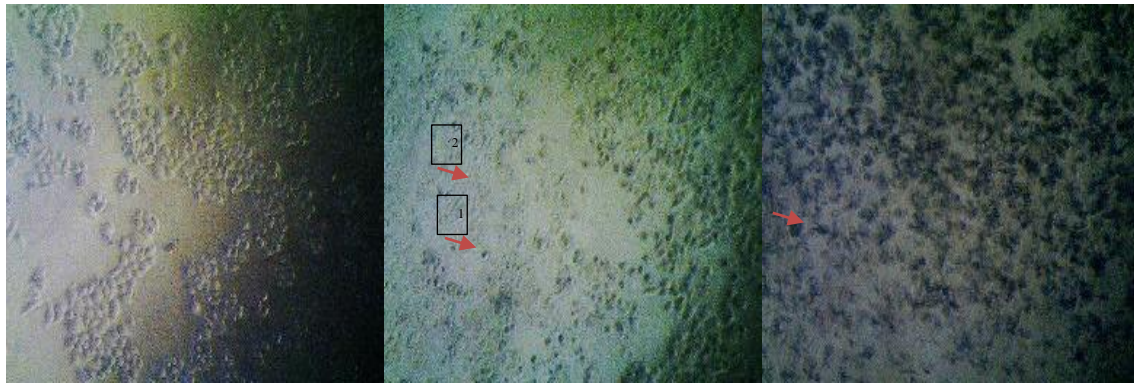
Tabel 2. Nilai rendemen (%) dan berat (g) masing-masing fraksi dari ekstrak etanol daun sirih merah

Fraksi	Berat (g)	Rendemen (%)
Heksan	2,12	53
Etil asetat	0,30	11,76
Air	0,80	20

Perhitungan rendemen tiga fraksi menunjukkan hasil yang berbeda-beda. Fraksi heksan memiliki berat dan nilai rendemen terbesar (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa senyawa yang tertarik dari ekstrak etanol dalam pelarut heksan lebih banyak dibanding pelarut etil asetat dan air. Nilai rendemen terkecil dimiliki oleh fraksi etil asetat karena sedikitnya senyawa semi polar dari ekstrak etanol yang tertarik dalam pelarut etil asetat. Pada penelitian yang dilakukan oleh Emrizal *et al.* (2014) didapatkan hasil yang berbeda, ekstrak metanol daun sirih merah memiliki rendemen 30,1153%, fraksi heksan 9,56%, fraksi etil asetat 20,99% dan fraksi butanol 24,18%. Nilai rendemen terbesar dimiliki oleh fraksi butanol karena banyaknya senyawa yang bersifat polar dari ekstrak metanol yang tertarik dalam pelarut butanol. Hasil yang berbeda dari penelitian sebelumnya dapat dipengaruhi oleh perbedaan polaritas pelarut metanol yang memiliki sifat lebih polar dibanding pelarut etanol yang memungkinkan pada saat ekstraksi menarik senyawa yang bersifat polar lebih banyak dan waktu pemisahan yang terlalu lama saat fraksinasi dapat mengurangi nilai rendemen karena senyawa yang kembali larut.

3.2 Uji Sitotoksik

Uji sitotoksik ekstrak etanol dan tiga fraksi daun sirih merah dilakukan pada sel kanker serviks HeLa dengan metode MTT. Metode ini memiliki prinsip terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT oleh sistem reduktase, membentuk kristal ungu formazan dan tidak larut air. Kemudian ditambahkan *reagen* yang bersifat detergenik yakni *stopper reagent* yang bertujuan melarutkan kristal ungu formazan. Jika jumlah sel hidup masih banyak, akan ditandai dengan semakin pekatnya warna ungu pada *plate* (CCRC, 2013).



(a)

(b)

(c)

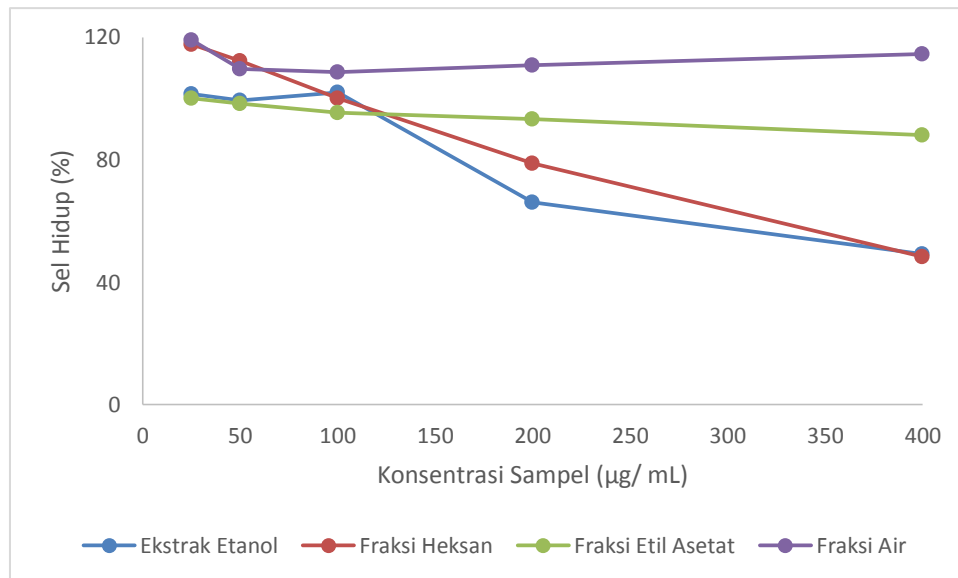
Gambar 1. Kontrol sel HeLa (a). 1: sel HeLa mati dan 2: sel HeLa hidup pada perlakuan sel dengan ekstrak etanol daun sirih merah konsentrasi 400 µg/ mL (b). Kristal formazan pada perlakuan sel dengan ekstrak etanol daun sirih merah konsentrasi 400 µg/ mL (c).

Pengamatan sel dilakukan untuk membedakan bentuk sel kontrol, sel yang sudah mati dan kristal formazan menggunakan mikroskop cahaya. Sel kanker HeLa yang masih hidup dan belum diberi perlakuan nampak berbentuk bulat dan bergerombol (Gambar 1). Sel yang sudah mati karena diberi perlakuan ekstrak etanol 400 µg/mL terlihat bulat dan memiliki inti berwarna hitam. Menurut *National Cancer Institute*, sampel dikatakan memiliki potensi sitotoksik yang kuat jika nilai $IC_{50} \leq 20$ µg/ mL, sedangkan efek sitotoksik yang moderat jika nilai IC_{50} 21-200 µg/ mL dan nilai IC_{50} 201-500 µg/ mL dikatakan memiliki aktivitas sitotoksik yang lemah, sedangkan nilai $IC_{50} \geq 501$ µg/ mL tidak memiliki efek sitotoksik.

Tabel 3. Nilai IC_{50} dan potensi sitotoksik ekstrak etanol dan tiga fraksi daun sirih merah terhadap sel kanker serviks HeLa

Sampel	Hasil	
	IC_{50} (µg/ mL)	Potensi sitotoksik*
Ekstrak Etanol	544,285	-
Fraksi Heksan	528,541	-
Fraksi Etil Asetat	>500	-
Fraksi Air	>500	-
Paklitaksel	8,153	Sitotoksik kuat

*Sumber: *National Cancer Institute*



Gambar 2. Pengaruh perlakuan ekstrak etanol, fraksi heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air terhadap ($\mu\text{g/ mL}$) rata-rata sel HeLa hidup (%)

Ekstrak etanol dan tiga fraksi memiliki nilai IC_{50} yang berbeda-beda. Ekstrak etanol dan fraksi heksan memiliki nilai IC_{50} berturut-turut sebesar $544,285 \mu\text{g/ mL}$ dan $528,541 \mu\text{g/ mL}$ yang menunjukkan ekstrak etanol dan fraksi heksan tidak memiliki efek. Fraksi etil asetat dan fraksi air juga tidak memiliki potensi sitotoksik karena nilai IC_{50} kedua sampel $\geq 501 \mu\text{g/ mL}$ (Tabel 3). Fraksi heksan dan fraksi etil asetat menunjukkan grafik yang linear karena semakin tinggi konsentrasi, semakin rendah rata-rata sel hidup (Gambar 2). Sementara ekstrak etanol dan fraksi air menunjukkan grafik yang tidak linear karena kenaikan konsentrasi tidak diikuti dengan banyaknya sel yang mati. Penelitian ini menggunakan kontrol positif paklitaksel untuk memastikan bahwa reagen, peralatan maupun protokol uji sitotoksik tidak mengalami kesalahan. Menurut Piver *et al.* (1999), paklitaksel dan platinum merupakan *first line* untuk pengobatan kanker serviks baik bagi pasien baru maupun penderita lama. Menurut Liebmann *et al.* (1993), nilai IC_{50} paklitaksel terhadap sel kanker HeLa sebesar $2,6 \text{ nM}$ dan menurut Akara *et al.* (2002), $0,136 \pm 0,238 \text{ nM}$. Nilai IC_{50} paklitaksel yang diperoleh pada penelitian ini sebesar $8,153 \mu\text{g/mL}$ dan paklitaksel memiliki potensi sitotoksik.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Wicaksono *et al.* (2009), ekstrak metanol daun sirih merah memiliki efek sitotoksik dengan nilai IC_{50} sebesar $44,25 \mu\text{g/mL}$ dan berpotensi menghambat proliferasi sel kanker payudara T47D. Fraksi heksan, etil asetat dan butanol daun sirih merah dengan metode *Brine Shrimp Lethality* (BSLT) memiliki nilai IC_{50} masing-masing sebesar $2,04 \mu\text{g/mL}$, $1,34 \mu\text{g/mL}$, dan $2,08 \mu\text{g/mL}$ (Emrizal *et al.*, 2014). Menurut Anugrahwati *et al.* (2016) ekstrak etanol daun sirih merah memiliki senyawa neopitadin, elimisin, dan asam propionat. Senyawa-senyawa tersebut mampu menghambat proliferasi sel HeLa dengan nilai LC_{50} $0,81 \pm 0,26 \text{ mg/mL}$. Ekstrak daun sirih merah menghambat pertumbuhan sel HeLa sebesar 86% dengan metode MTT (Suci,

2014). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun sirih merah memiliki aktivitas sitotoksik yang poten pada sel T47D dan fraksi heksan, etil asetat serta fraksi butanol memiliki aktivitas sitotoksik yang poten dengan metode BSLT dibanding ekstrak etanol dan fraksi heksan, fraksi etil asetat serta fraksi air terhadap sel HeLa dengan metode MTT.

3.3 Uji Kandungan Golongan Senyawa dengan KLT

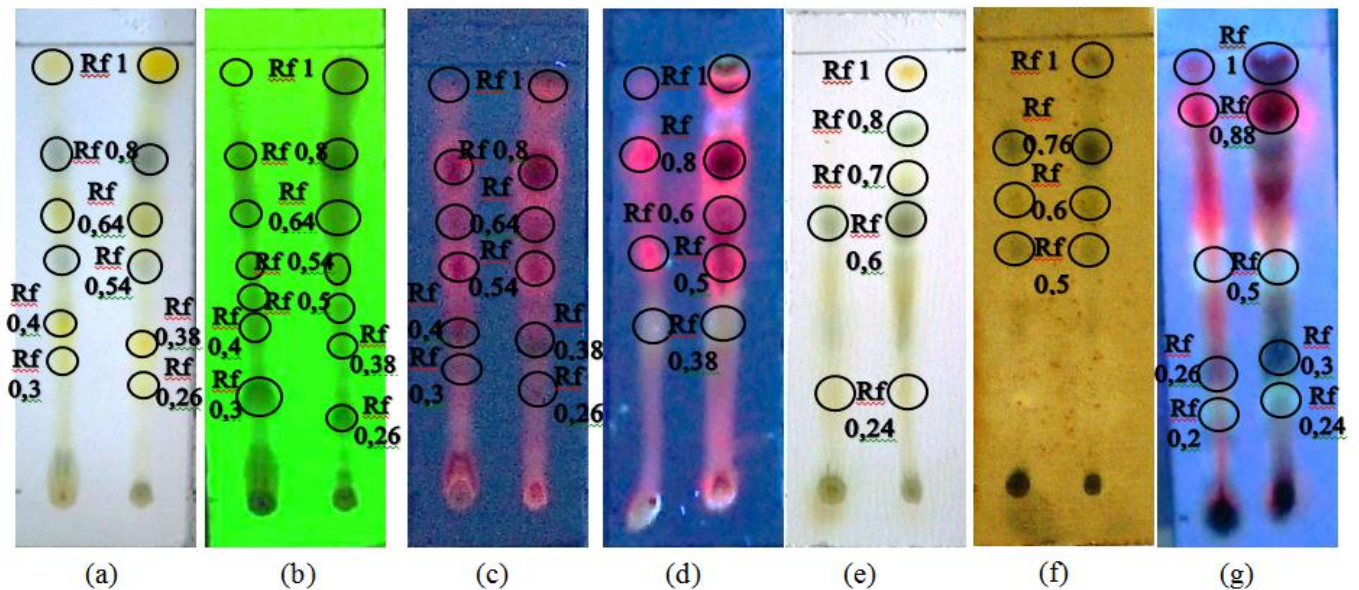
Uji KLT dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa yang terdapat pada ekstrak etanol dan tiga fraksi. Metode pemisahan yang digunakan yakni kromatografi lapis tipis karena mudah dilakukan, lebih sederhana, dan setiap laboratorium dapat melaksanakan secara tepat. KLT memiliki fase diam yaitu lapisan seragam pada permukaan datar yang didukung plat plastik, kaca ataupun alumunium dan memiliki fase gerak sebagai pelarut yang menghantarkan pemisahan senyawa sepanjang fase diam secara menaik atau menurun (Gandjar, 2009). Penelitian ini menggunakan fase diam silika gel GF254 dan fase gerak yang berbeda tiap sampel. Ekstrak etanol dan fraksi heksan menggunakan fase gerak heksan:etil asetat (7:3), fraksi etil asetat menggunakan heksan:etil asetat (6:4) dan diklorometana:methanol (8:2) untuk fraksi air. Perbedaan fase gerak di tiap ekstrak dan tiga fraksi dipengaruhi oleh tingkat polaritas senyawa golongan yang berbeda di masing-masing ekstrak dan tiga fraksi

Tabel 4. Deteksi golongan senyawa ekstrak etanol dan tiga fraksi

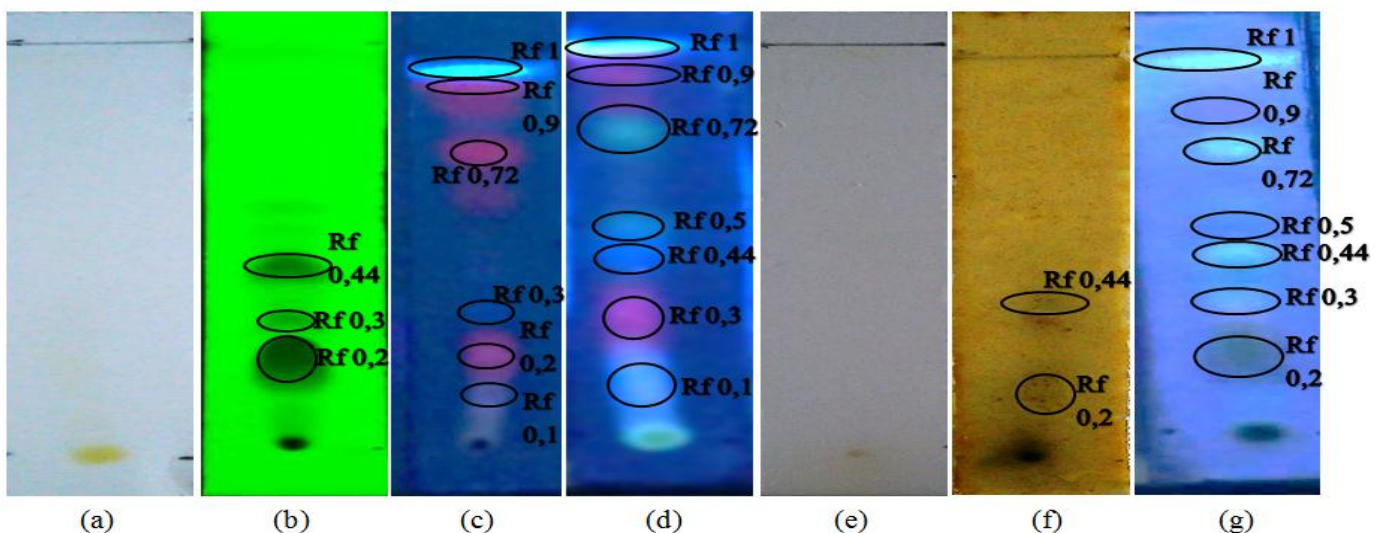
Sampel	Kandungan
Ekstrak etanol	Alkaloid, fenolik, flavonoid, steroid, triterpene
Fraksi Heksan	Alkaloid, fenolik, flavonoid, steroid, triterpene
Fraksi Etil Asetat	Fenolik, flavonoid, steroid, triterpene
Fraksi Air	Fenolik

Hasil analisis kandungan senyawa dipengaruhi oleh tingkat polaritas pelarut dan sifat kepolaran senyawa yang berbeda dalam ekstrak etanol dan tiga fraksi. Pada ekstrak etanol dan fraksi heksan menunjukkan adanya senyawa flavonoid, alkaloid, fenolik, triterpen, dan steroid (Tabel 4, Gambar 3). Fraksi etil asetat mengandung flavonoid, fenolik, triterpen, dan steroid (Tabel 4, Gambar 4). Sementara fraksi air mengandung fenolik (Tabel 4, Gambar 5). Menurut Suhermanto (2013), ekstrak daun sirih merah mengandung flavonoid, alkaloid dan tanin. Daun sirih merah mengandung saponin, tanin dan terpen yang digunakan untuk pengobatan kanker payudara (Arome dan Amarachi, 2014). Menurut Emrizal *et al.* (2014), ekstrak metanol daun sirih merah dan fraksi butanol mengandung senyawa fenolik, flavonoid, terpenoid dan steroid. Pada fraksi etil asetat dan fraksi heksan mengandung terpen dan steroid. Anugrahwati *et al.* (2016), mengidentifikasi adanya senyawa neopitadin, eliminisin, dan asam propionat dalam ekstrak etanol daun sirih merah. Senyawa-senyawa tersebut mampu menghambat proliferasi sel HeLa. Perbedaan kandungan senyawa dengan penelitian

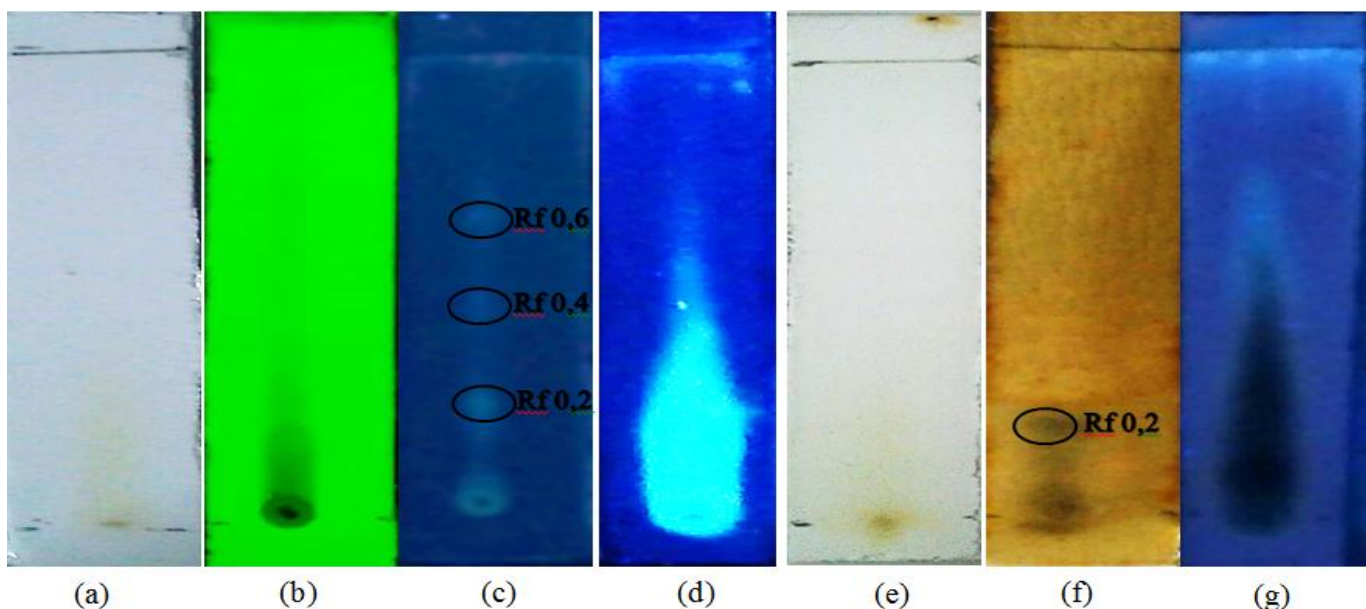
terdahulu dapat dipengaruhi oleh perbedaan fase gerak dan rasio jumlah fase gerak yang digunakan karena metode KLT menggunakan pemisahan berdasarkan sifat kepolaran senyawa yang berdampak pada hasil kandungan yang berbeda.



Gambar 3. Hasil uji KLT 1: ekstrak etanol daun sirih merah dan 2: fraksi heksan dengan fase gerak heksan:etil asetat (7:3) dan fase diam silika gel GF₂₅₄. Pemisahan pada sinar tampak (a). Pemisahan pada UV 254 (b). Pemisahan pada UV 366 (c). Pemisahan setelah disemprot reagen sitroborat di UV 366 (d). Pemisahan setelah disemprot reagen Dragendorff di sinar tampak (e). Pemisahan setelah disemprot reagen FeCl₃ di sinar tampak (f). Pemisahan setelah disemprot reagen Liebermann-Burchard di UV 366 (g).



Gambar 4. Hasil uji KLT fraksi etil asetat dengan fase gerak heksan:etil asetat (6:4) dan fase diam silika gel GF₂₅₄. Pemisahan pada sinar tampak (a). Pemisahan pada UV 254 (b). Pemisahan pada UV 366 (c). Pemisahan setelah disemprot reagen sitroborat di UV 366 (d). Pemisahan setelah disemprot reagen Dragendorff di sinar tampak (e). Pemisahan setelah disemprot reagen FeCl₃ di sinar tampak (f). Pemisahan setelah disemprot reagen Liebermann-Burchard di UV 366 (g).



Gambar 5. Hasil uji KLT fraksi air dengan fase gerak diklorometana:metanol (8:2) dan fase diam silika gel GF₂₅₄. Pemisahan pada sinar tampak (a). Pemisahan pada UV 254 (b). Pemisahan pada UV 366 (c). Pemisahan setelah disemprot reagen sitroborat di UV 366 (d). Pemisahan setelah disemprot reagen Dragendorff di sinar tampak (e). Pemisahan setelah disemprot reagen FeCl₃ di sinar tampak (f). Pemisahan setelah disemprot reagen Liebermann-Burchard di UV 366(g).

Hasil penelitian ekstrak etanol dan fraksi heksan memiliki kandungan senyawa yakni flavonoid, alkaloid, fenolik, triterpene dan steroid dengan nilai IC₅₀ masing-masing sebesar 544,29 µg/mL dan 528,54 µg/mL. Kandungan yang sama antara ekstrak dan fraksi heksan juga menunjukkan selisih nilai IC₅₀ yang tidak terlampau jauh. Fraksi etil asetat mengandung senyawa flavonoid, fenolik, triterpen dan steroid, sedangkan fraksi air mengandung senyawa fenolik, masing-masing fraksi tidak memiliki nilai IC₅₀ karena tidak mampu menghambat 50% sel hidup.

4. PENUTUP

Ekstrak etanol daun sirih merah dan fraksi heksan tidak memiliki potensi sitotoksik dengan nilai IC₅₀ masing-masing sebesar 544,29 µg/mL dan 528,54 µg/mL. Fraksi etil asetat dan fraksi air juga tidak memiliki potensi sitotoksik terhadap sel HeLa karena IC₅₀ ≥ 501 µg/mL. Kandungan senyawa yang dimiliki ekstrak etanol dan fraksi heksan ialah flavonoid, alkaloid, fenolik, triterpen dan steroid. Fraksi etil asetat mengandung senyawa flavonoid, fenolik, triterpen dan steroid, sedangkan fraksi air mengandung senyawa fenolik.

DAFTAR PUSTAKA

- Akara K.T., Akaeda T.S., Agami T.Y., Obayashi H.K., Hmoto N.O., Orinouchi M.H., Ishiguchi K.N. dan Kumura K.O., 2002, Cytotoxic Effects of 27 Anticancer Drugs in HeLa and MDR1-Overexpressing Derivative Cell Lines, *Biol. Pharm. Bull.*, 25 (6), 771–778.
- Anugrahwati M., Purwaningsih T., Manggalarini J.A. dan Alnavis N.B., 2016, Extraction of Ethanolic Extract of Red Betel Leaves and Its Cytotoxicity Test on HeLa Cells, *Procedia Engineering*, 148, 1402–1407. Terdapat di: <http://dx.doi.org/10.1016/j.proeng.2016.06.569>.
- Archana P., Samatha T., Mahitha B. dan Chamundeswari, 2012, Preliminary Phytochemical Screening from Leaf and Seed Extracts of *Senna alata* L. Roxb-an Ethnomedicinal plant, *International Journal of Pharmaceutical and Biological Research (IJPBR)*, 3 (3), 82–89.
- Arome D. dan Amarachi A., 2014, A Review on Herbal Plants with Anti-Tumour Properties, *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 2 (August), 43–58.
- CCRC C.C.R.C., 2013, *Protokol Uji Sitotoksik Metode MTT*, Fakultas Farmasi, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.
- Emrizal, Fernando A., Yuliandari R. dan Rullah K., 2014, Cytotoxic Activities of Fractions and Two Isolated Compounds from Sirih Merah (Indonesian red betel), *Piper crocatum* Ruiz & Pav, *Procedia Chemistry*, 13, 79–84. Terdapat di: <http://dx.doi.org/10.1016/j.proche.2014.12.009>.
- Farnsworth N., 1966, Biological and Phytochemical Screening of Plants, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55, 225–269.
- Kementrian Kesehatan RI Pusat Data dan Informasi Kesehatan, 2015, Stop Kanker, *infodatin-Kanker*, hal 3.
- Gandjar dan Rohman, 2009, *Kimia Farmasi Analisis*, Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
- Goldin A, Venditti JM, Macdonald JS, Muggia FM, Henney JE, Devita VT Jr., 1965, Current results of the screening program at the Division of Cancer Treatment, *National Cancer Institute. Eur J Cancer*, 17: 129-42.
- Liebmann J.E., Cook J.A., Lipschultz C., Teague D., Fisher J. dan Mitchell J.B., 1993, Cytotoxic Studies of Paclitaxel (Taxol®) in Human Tumour Cell Lines, *Journal Cancer*, 68, 1104–1109.
- Marth C., Landoni F., Mahner S. dan McCormack M., 2017, Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Clinical Practice Guidelines, *Annals of Oncology*, 28 (November), 72–83.
- Piver M.S., Ghamande S.A., Eltabbakh G.H. dan Neill-coppola C.O., 1999, First-Line Chemotherapy with Paclitaxel and Platinum for Advanced and Recurrent Cancer of the Cervix — A Phase II Study, 337, 334–337.

- Setiawan S.D., 2015, The Effect Of Chemotherapy In Cancer Patient to Anxiety, *Journal Majority*, 4, 94–99.
- Siegel R.L., Miller K.D. dan Jemal A., 2016, Cancer Statistics , 2016, *CA Cancer J Clin*, 66 (1), 7–30.
- Suci D.A.P., 2014, *Potensi Antikanker Ekstrak Daun Sirih Merah (Piper crocatum) Terhadap Sel HeLa “Skripsi,”*
- Suhermanto, 2013, *Profil Flavonoid, Tanin, dan Alkaloid dari Ekstrak Daun Sirih Merah (Piper crocatum),*. Institut Pertanian Bogor.
- Wagner H. dan Baldt S., 1996, *Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas*, Second Edi., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, London, New York.
- Wicaksono B.D., Handoko Y.A., Arung E.T., Kusuma I.W., Yulia D., Pancaputra A.N. dan Sandra F., 2009, Antiproliferative Effect of the Methanol Extract of Piper crocatum Ruiz & Pav Leaves on Human Breast (T47D) Cells In-vitro, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8 (February), 345–352.
- Yudhani R.D., 2014, Farmakogenomik dan Terapi Kanker, *Continuing Development Professional*, 41 (6), 412–415.